



These Test Guidelines have been superseded by a later version. The latest adopted version of Test Guidelines can be found at [http://www.upov.int/test\\_guidelines/en/list.jsp](http://www.upov.int/test_guidelines/en/list.jsp)

---

Ces principes directeurs d'examen ont été remplacés par une version ultérieure. La version adoptée la plus récente des principes directeurs d'examen figure à l'adresse suivante : [http://www.upov.int/test\\_guidelines/fr/list.jsp](http://www.upov.int/test_guidelines/fr/list.jsp)

---

Diese Prüfungsrichtlinien wurden durch eine neuere Fassung ersetzt. Die neueste angenommene Fassung von Prüfungsrichtlinien ist unter [http://www.upov.int/test\\_guidelines/de/list.jsp](http://www.upov.int/test_guidelines/de/list.jsp) zu finden.

---

Las presentes directrices de examen han sido reemplazadas por una versión posterior. La versión de las directrices de examen de más reciente aprobación está disponible en [http://www.upov.int/test\\_guidelines/es/list.jsp](http://www.upov.int/test_guidelines/es/list.jsp).



INTERNATIONAL UNION  
FOR THE PROTECTION  
OF NEW VARIETIES OF  
PLANTS

UNION INTERNATIONALE  
POUR LA PROTECTION  
DES OBTENTIONS  
VÉGÉTALES

INTERNATIONALER  
VERBAND ZUM SCHUTZ  
VON PFLANZEN-  
ZÜCHTUNGEN

UNIÓN INTERNACIONAL  
PARA LA PROTECCIÓN  
DE LAS OBTENCIONES  
VEGETALES

**PRINCIPES DIRECTEURS**  
**POUR LA CONDUITE DE L'EXAMEN**  
**DES CARACTÈRES DISTINCTIFS, DE L'HOMOGENÉITÉ**  
**ET DE LA STABILITÉ**

**SOJA**  
*(Glycine max (L.) Merrill.)*

**1998**  
**Genève**

Des exemplaires de ce document peuvent être obtenus sur demande au prix de 10 francs suisses l'exemplaire, y compris les frais de port par voie de surface, en s'adressant au Bureau de l'UPOV, 34, chemin des Colombettes, boîte postale 18, 1211 Genève 20, Suisse.

Ce document peut être reproduit, traduit et publié, en tout ou en partie, sans qu'il soit nécessaire d'obtenir l'autorisation expresse de l'UPOV pour autant que la source soit mentionnée.

\* \* \* \* \*



INTERNATIONAL UNION  
FOR THE PROTECTION  
OF NEW VARIETIES OF  
PLANTS

UNION INTERNATIONALE  
POUR LA PROTECTION  
DES OBTENTIONS  
VÉGÉTALES

INTERNATIONALER  
VERBAND ZUM SCHUTZ  
VON PFLANZEN-  
ZÜCHTUNGEN

UNIÓN INTERNACIONAL  
PARA LA PROTECCIÓN  
DE LAS OBTENCIONES  
VEGETALES

**PRINCIPES DIRECTEURS  
POUR LA CONDUITE DE L'EXAMEN  
DES CARACTÈRES DISTINCTIFS, DE L'HOMOGENÉITÉ  
ET DE LA STABILITÉ**

**SOJA**

***(Glycine max (L.) Merrill.)***

Ces principes directeurs doivent être interprétés en relation avec le document TG/1/2, qui contient des explications sur les principes généraux qui sont à la base de leur rédaction.

<u>SOMMAIRE</u>	<u>PAGE</u>
I. Objet de ces principes directeurs .....	3
II. Matériel requis .....	3
III. Conduite de l'examen .....	3
IV. Méthodes et observations .....	3
V. Groupement des variétés .....	4
VI. Caractères et symboles .....	4
VII. Tableau des caractères .....	5
VIII. Explications du tableau des caractères .....	11
IX. Littérature.....	20
X. Questionnaire technique .....	21

ANNEXE

## I. Objet de ces principes directeurs

Ces principes directeurs d'examen s'appliquent à toutes les variétés de *Glycine max* (L.) Merrill.

## II. Matériel requis

1. Les autorités compétentes décident de la quantité de matériel végétal nécessaire pour l'examen de la variété, de sa qualité ainsi que des dates et lieux d'envoi. Il appartient au demandeur qui soumet du matériel provenant d'un pays autre que celui où l'examen doit avoir lieu de s'assurer que toutes les formalités douanières ont été dûment accomplies. La quantité minimale de semences à fournir par le demandeur en un ou plusieurs échantillons sera de :

2 kg.

Les semences doivent au moins satisfaire les conditions minimales exigées pour la faculté germinative, la teneur en eau et la pureté pour la commercialisation des semences certifiées dans le pays dans lequel la demande est faite. La faculté germinative doit être aussi élevée que possible.

2. Le matériel végétal ne doit pas avoir subi de traitement sauf autorisation ou demande expresse des autorités compétentes. S'il a été traité, le traitement appliqué doit être indiqué en détail.

## III. Conduite de l'examen

1. La durée minimale d'examen est en règle générale de deux cycles similaires de végétation.

2. Les essais doivent être conduits en un seul lieu. Si ce lieu ne permet pas de faire apparaître certains caractères importants de la variété, celle-ci peut aussi être étudiée dans un autre lieu.

3. Les essais au champ doivent être conduits dans des conditions normales de culture. La taille des parcelles doit être telle que l'on puisse prélever des plantes ou parties de plantes pour effectuer des mesures ou des dénombrements sans nuire aux observations ultérieures qui doivent se poursuivre jusqu'à la fin de la période de végétation. Chaque essai doit porter sur environ 300 plantes, qui doivent être réparties en deux ou plusieurs répétitions. On ne peut utiliser de parcelles séparées, destinées l'une aux observations et l'autre aux mesures, que si elles sont soumises à des conditions de milieu similaires.

4. Des essais additionnels peuvent être établis pour certaines déterminations.

## IV. Méthodes et observations

1. Toutes les observations sur la détermination de la distinction et de la stabilité doivent porter sur 20 plantes ou parties de 20 plantes.

2. Pour l'évaluation de l'homogénéité il faut appliquer une norme de population de 0,5 % avec une probabilité d'acceptation d'au moins de 95 %. Dans le cas d'un échantillon de 300 plantes, le nombre maximal de plantes aberrantes toléré sera de 4.

3. Toutes les observations sur la feuille et le fleur doivent être effectuées à l'époque de pleine floraison.

#### V. Groupement des variétés

1. La collection des variétés à cultiver doit être divisée en groupes pour faciliter la détermination de la distinction. Les caractères à utiliser pour définir les groupes sont ceux dont on sait par expérience qu'ils ne varient pas, ou qu'ils varient peu, à l'intérieur d'une variété. Les différents niveaux d'expression doivent être assez uniformément répartis dans la collection.

2. Il est recommandé aux autorités compétentes d'utiliser les caractères ci-après pour le groupement des variétés :

- a) Plante : couleur de la pilosité de la tige principale (au tiers central) (caractère 5)
- b) Fleur : couleur (caractère 11)
- c) Graine : couleur du hile (caractère 17)
- d) Plante : époque de maturité (caractère 20)

#### VI. Caractères et symboles

1. Pour évaluer les possibilités de distinction, l'homogénéité et la stabilité, on doit utiliser les caractères indiqués dans le tableau des caractères avec leurs différents niveaux d'expression.

2. En regard des différents niveaux d'expression des caractères, sont indiquées des notes (chiffres) destinées au traitement électronique des données.

3. Légende :

(\*) Caractères qui doivent être utilisés pour toutes les variétés, à chaque cycle de végétation au cours duquel les essais sont réalisés, et qui doivent toujours figurer dans la description de la variété, sauf si le niveau d'expression d'un caractère précédent ou les conditions de milieu régionales le rendent impossible.

(+) Voir l'explication du tableau des caractères au chapitre VIII

1) Le stade optimal de développement pour l'observation de chaque caractère est indiqué par un nombre dans la deuxième colonne. Les stades de développement correspondant à chaque nombre sont décrits à la fin du chapitre VIII.

VII. Table of Characteristics/Tableau des caractères/Merkmalstabelle/Tabla de caracteres

Stage <sup>1)</sup> Stade <sup>1)</sup> Stadium <sup>1)</sup> Estado <sup>1)</sup>	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
<b>1. 10</b> <b>(*)</b>	<b>Hypocotyl: anthocyanin coloration</b>	<b>Hypocotyle: pigmentation anthocyanique</b>	<b>Hypokotyl: Anthocyanfärbung</b>	<b>Hipocotilo: pigmentación antociánica</b>		
	absent	absente	fehlend	ausente	Chandor, Goldor	1
	present	présente	vorhanden	presente	Alaric, Apache, Imari	9
<b>2. 10</b>	<b>Hypocotyl: intensity of anthocyanin coloration</b>	<b>Hypocotyle: intensité de la pigmentation anthocyanique</b>	<b>Hypokotyl: Intensität der Anthocyanfärbung</b>	<b>Hipocotilo: intensidad de la pigmentación antociánica</b>		
	very weak	très faible	sehr gering	muy débil	Azzurra	1
	weak	faible	gering	débil	Akashi, Candir	3
	medium	moyenne	mittel	media	Canton, Kendo	5
	strong	forte	stark	fuerte	Aries, Visir	7
	very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte		9
<b>3.</b> <b>(*)</b> <b>(+)</b>	<b>Plant: growth type</b>	<b>Plante: croissance</b>	<b>Pflanze: Wuchstyp</b>	<b>Planta: crecimiento</b>		
	determinate	déterminée	begrenzt wachsend	determinado	Gnome, Spot, Fiskeby	1
	semi-determinate	semi-déterminée	halb begrenzt wachsend	semideterminado	Alaric, Alba, Silvia, Paradis	2
	semi-determinate to indeterminate	semi-déterminée à indéterminée	halb begrenzt wachsend bis unbegrenzt wachsend	semideterminado a indeterminado	Chandor, Kador	3
	indeterminate	indéterminée	unbegrenzt wachsend	indeterminado		4



	Stage <sup>1)</sup> Stade <sup>1)</sup> Stadium <sup>1)</sup> Estado <sup>1)</sup>	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
<b>4.</b>	<b>66</b>	<b>Plant: growth habit</b>	<b>Plante: port</b>	<b>Pflanze: Wuchsform</b>	<b>Planta: porte</b>		
(+)		erect	dressé	aufrecht	erecto		1
		erect to semi-erect	dressé à demi-dressé	aufrecht bis halbaufrecht	erecto a semierecto	Tirol, Queen, Essor, Labrador	2
		semi-erect	demi-dressé	halbaufrecht	semierecto	Chandor, Apache, Paoki	3
		semi-erect to horizontal	demi-dressé à horizontal	halbaufrecht bis waagerecht	semierecto a horizontal	Alaric, Major, Sapporo	4
		horizontal	horizontal	waagerecht	horizontal		5
<b>5.</b>	<b>65-85</b>	<b>Plant: color of hairs of main stem (on middle third)</b>	<b>Plante: couleur de la pilosité de la tige principale (au tiers central)</b>	<b>Pflanze: Farbe der Behaarung des Haupttriebes (im mittleren Drittel)</b>	<b>Planta: color de la vellosidad del tallo principal (en el tercio central)</b>		
(*)		grey	grise	grau	gris	Apache, Alaric, Talon, Imari	1
		tawny	fauve	gelbbraun	castaño	Maple Glen, Chandor, Paoki, Agata	2
<b>6.</b>	<b>85</b>	<b>Plant: height</b>	<b>Plante: hauteur</b>	<b>Pflanze: Höhe</b>	<b>Planta: altura</b>		
(*)		short	basse	niedrig	baja	Carla, Paradis, Spot	3
		short to medium	basse à moyenne	niedrig bis mittel	baja a media	Trump, Essor	4
		medium	moyenne	mittel	media	Alaric, Chandor	5
		medium to tall	moyenne à haute	mittel bis hoch	media a alta	Kador	6
		tall	haute	hoch	alta	Tirol, Toréador	7

	Stage <sup>1)</sup> Stade <sup>1)</sup> Stadium <sup>1)</sup> Estado <sup>1)</sup>	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
<b>7.</b>	<b>65</b>	<b>Leaf: blistering</b>	<b>Feuille: cloûre</b>	<b>Blatt: Blasigkeit</b>	<b>Hoja: abullonado</b>		
		absent or very weak	absente ou très faible	fehlend oder sehr gering	ausente o muy débil	Bayou, Arpège, Chandor	1
		weak	faible	gering	débil	Kador, Quito	3
		medium	moyenne	mittel	medio	Paoki, Imari	5
		strong	forte	stark	fuerte	Matador	7
		very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte		9
<b>8.</b>	<b>65</b> (* (+)	<b>Leaf: shape of lateral leaflet</b>	<b>Feuille: forme de la foliole latérale</b>	<b>Blatt: Form der Seitenfieder</b>	<b>Hoja: forma del foliolo lateral</b>		
		lanceolate	lancéolée	lanzettlich	lanceolado	Toréador, Dumas, Trésor	1
		triangular	triangulaire	dreieckig	triangular	Contessa	2
		pointed ovate	pointue ovale	spitz eiförmig	oval puntiagudo	Kador, Major, Apache, Talon	3
		rounded ovate	arrondie ovale	abgerundet eiförmig	oval redondeado	Paoki, Agata, Chandor	4
<b>9.</b>	<b>65</b>	<b>Leaf: size of lateral leaflet</b>	<b>Feuille: taille de la foliole latérale</b>	<b>Blatt: Größe der Seitenfieder</b>	<b>Hoja: tamaño del foliolo lateral</b>		
		small	petite	klein	pequeño	Trump, Labrador, Baron, Arcade	3
		medium	moyenne	mittel	mediano	Alaric, Kushiro, Talon	5
		large	grande	groß	grande	Williams	7
<b>10.</b>	<b>65</b>	<b>Leaf: intensity of green color</b>	<b>Feuille: intensité de la couleur verte</b>	<b>Blatt: Intensität der Grünfärbung</b>	<b>Hoja: intensidad del color verde</b>		
		light	claire	hell	claro	Chandor, Arcade, Junior	3
		medium	moyenne	mittel	medio	Alaric, Apache, Imari	5
		dark	foncée	dunkel	oscuro	Spot. Cresir, Jedor, Ardir	7

	Stage <sup>1)</sup> Stade <sup>1)</sup> Stadium <sup>1)</sup> Estado <sup>1)</sup>	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
<b>11.</b>	<b>66</b>	<b>Flower: color</b>	<b>Fleur: couleur</b>	<b>Blüte: Farbe</b>	<b>Flor: color</b>		
(*)		white	blanche	weiß	blanca	Chandor, Crésir, Toréador	1
		violet	violette	violett	violeta	Fransoy 242, Imari, Apache, Queen	2
<b>12.</b>	<b>85</b>	<b>Pod: intensity of brown color</b>	<b>Gousse: intensité de la couleur brune</b>	<b>Hülse: Intensität der Braunfärbung</b>	<b>Vaina: intensidad del color marrón</b>		
		light	claire	hell	clara	Chandor, Contessa, Alba, Arcade	3
		medium	moyenne	mittel	media	Alaric, Apache, Fuji, Paoki	5
		dark	foncée	dunkel	oscura	Toréador, Tirol, Royal	7
<b>13.</b>	<b>89</b>	<b>Seed: size</b>	<b>Graine: grosseur</b>	<b>Samen: Größe</b>	<b>Semilla: tamaño</b>		
		small	petite	klein	pequeña	Alba, Aurélia, Flusk GT 512	3
		medium	moyenne	mittel	mediana	Queen, Goldor	5
		large	grande	groß	grande	Clédor, Cervin, Mondor	7
<b>14.</b>	<b>89</b>	<b>Seed: shape</b>	<b>Graine: forme</b>	<b>Samen: Form</b>	<b>Semilla: forma</b>		
		spherical	sphérique	kugelförmig	subesférica	Paoki, Valkir, Niva	1
		spherical flattened	sphérique aplatie	kugelförmig abgeflacht	subesférica aplanada	Queen, Sapporo, Clédor	2
		elongated	allongée	länglich	alargada	Soleo, Talon, Excel, Recor	3
		elongated flattened	allongée aplatie	länglich abgeflacht	alargada aplanada		4

	Stage <sup>1)</sup> Stade <sup>1)</sup> Stadium <sup>1)</sup> Estado <sup>1)</sup>	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota			
<b>15. 89</b> (* )	<b>Seed: ground color of testa (excluding hilum)</b>	<b>Graine: couleur de fond du tégument (à l'exclusion du hile)</b>	<b>Samen: Grundfarbe der Samenschale (ohne Nabel)</b>	<b>Semilla: color de fondo del tegumento (excluyendo el filamento)</b>	yellow	claire	gelb	amarillo	Queen, Paoki	1
					yellow green	vert jaune	gelbgrün	verde amarillento		2
					green	verte	grün	verde		3
					light brown	brun clair	hellbraun	marrón claro		4
					medium brown	brun moyen	mittelbraun	marrón medio		5
					dark brown	brun foncé	dunkelbraun	marrón oscuro		6
					black	noire	schwarz	negro		7
<b>16. 89</b> (+ )	<b>Seed: coloration due to peroxidase activity in seed coat</b>	<b>Graine: coloration due à l'activité peroxidase dans le tégument</b>	<b>Samen: Färbung hervorgerufen durch Peroxidaserreaktion in der Samenschale</b>	<b>Semillas: coloración debida a la actividad de peroxidasa en el tegumento</b>	absent	absente	fehlend	ausente	Bragg	1
					present	présente	vorhanden	presente	Hood, Hood 75	2
<b>17. 89</b> (* )	<b>Seed: hilum color</b>	<b>Graine: couleur du hile</b>	<b>Samen: Farbe des Nabels</b>	<b>Semilla: color del hilo</b>	grey	gris	grau	gris	Spot, Major, Apache	1
					yellow	jaune	gelb	amarillo	Maple Arrow, Imari, Talon	2
					light brown	brun clair	hellbraun	marrón claro	Kingsoy, Argenta, Baron, Opale	3
					dark brown	brun foncé	dunkelbraun	marrón oscuro	Fransoy 242, Aurélia, Léman	4
					imperfect black	noir imparfait	fast schwarz	negro imperfecto	Wells, Kador, Folio	5
					black	noir	schwarz	negro	Chandor, Queen, Paoki	6
<b>18. 89</b>	<b>Seed: color of hilum funicle</b>	<b>Graine: couleur de l'attache hilaire</b>	<b>Samen: Farbe des Nabelansatzes</b>	<b>Semilla: color de la inserción del hilo</b>	same as testa	même couleur que le tégument	wie Samenschale	igual que el del tegumento	Queen	1
					different to testa	couleur différente du tégument	anders als Samenschale	diferente de el del tegumento	Gieso	2

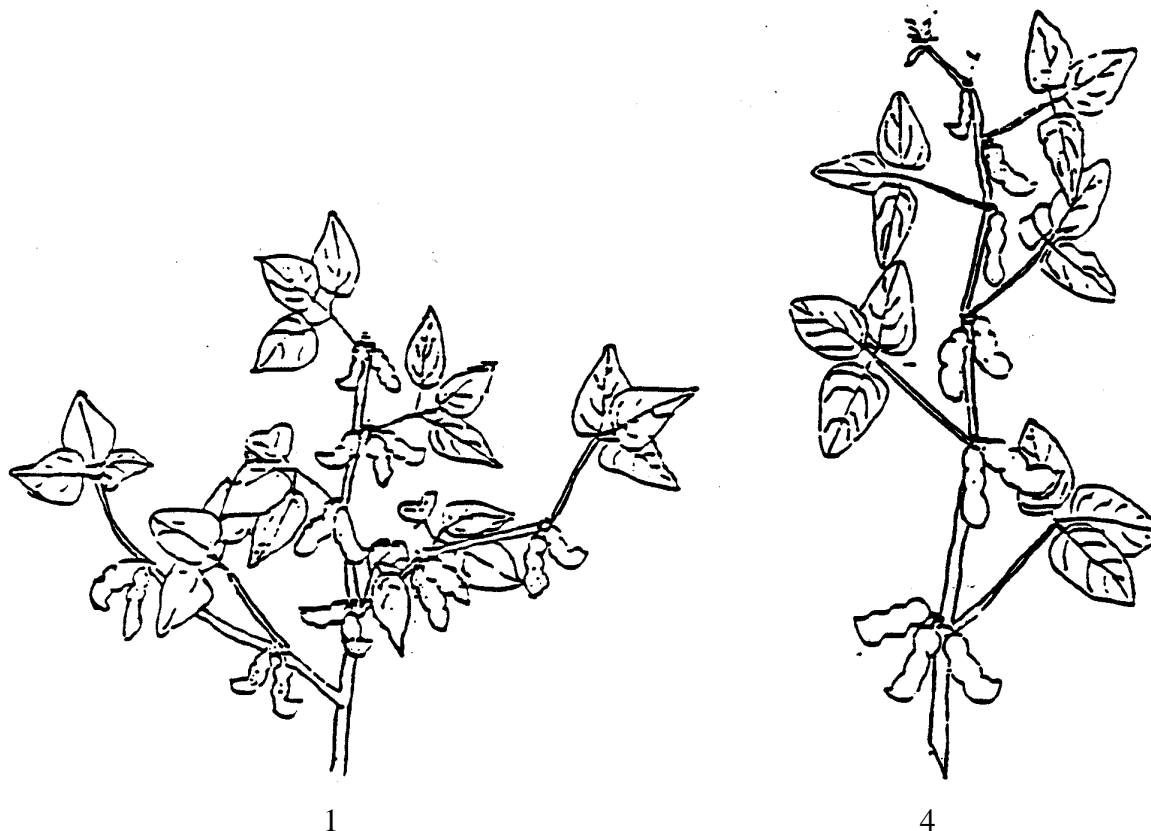
Stage <sup>1)</sup> Stade <sup>1)</sup> Stadium <sup>1)</sup> Estado <sup>1)</sup>	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
<b>19.</b> (* )	<b>Plant: time of beginning of flowering (50% plants with at least one flower open)</b>	<b>Plante: époque de début de floraison (50 % des plantes avec au moins une fleur ouverte)</b>	<b>Pflanze: Zeitpunkt des Blühbeginns (50 % der Pflanzen mit mindestens einer geöffneten Blüte)</b>	<b>Planta: fecha del comienzo de la floración (50 % de las plantas con al menos una flor abierta)</b>		
	very early	très précoce	sehr früh	muy precoz	Sito, Trump, Carla, Paradis	1
	very early to early	très précoce à précoce	sehr früh bis früh	muy precoz a precoz	Labrador, Essor, Arcade	2
	early	précoce	früh	precoz	Canton, Queen, Imari	3
	early to medium	précoce à moyenne	früh bis mittel	precoz a media	Kador, Alaric, Niva	4
	medium	moyenne	mittel	media	Williams	5
	medium to late	moyenne à tardive	mittel bis spät	media a tardía		6
	late	tardive	spät	tardía		7
	late to very late	tardive à très tardive	spät bis sehr spät	tardía a muy tardía		8
	very late	très tardive	sehr spät	muy tardía		9
<b>20.</b> (* )	<b>89</b> <b>Plant: time of maturity</b>	<b>Plante: époque de maturité</b>	<b>Pflanze: Zeitpunkt der Reife</b>	<b>Planta: fecha de la madurez</b>		
	very early	très précoce	sehr früh	muy precoz	Trump, Soléo, Kola, Carla, Paradis	1
	very early to early	très précoce à précoce	sehr früh bis früh	muy precoz a precoz	Chandor, Apache, Labrador	2
	early	précoce	früh	precoz	Canton, Queen, Paoki, Aurélia	3
	early to medium	précoce à moyenne	früh bis mittel	precoz a media	Kador, Kingsoy, Alaric, Niva	4
	medium	moyenne	mittel	media	Williams	5
	medium to late	moyenne à tardive	mittel bis spät	media a tardía		6
	late	tardive	spät	tardía		7
	late to very late	tardive à très tardive	spät bis sehr spät	tardía a muy tardía		8
	very late	très tardive	sehr spät	muy tardía		9

## VIII. Explications du tableau des caractères

### Add. 3 : Plante : croissance

- Dispositif d'essai : Ce caractère doit être observé de préférence en 3 ou 4 répétitions avec 20 plantes chacune avec une distance de plantes dans les lignes d'environ 9 cm. Il faut exclure tout effet de bordure.
- Matériel végétal : Les variétés candidates et les variétés exemples doivent être groupées selon leur précocité (caractère 20).
- Observation :  
Au début de la floraison (une fleur sur n'importe quel niveau de la tige principale), l'extrémité de la plante doit être marquée.  
À l'époque de maturité (des semences libres dans la gousse), le nombre de noeuds entre le marquage et l'extrémité de la plante doit être compté. Le nombre moyen par variété en comparaison avec des variétés exemples – se présente le niveau d'expression du caractère.

De plus, le caractère "taille de la feuille terminale" peut être considéré pour séparer plus clairement le stade d'expression "déterminée (Note 1)" des autres stades d'expression. La feuille terminale de la tige principale des variétés déterminées a environ la même taille que les autres feuilles aux niveaux inférieurs. Pour les autres types, la feuille terminale est nettement plus petite.



déterminée

indéterminée

Add. 4 : Plante : port



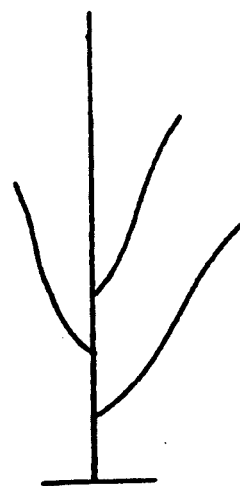
1

dressé



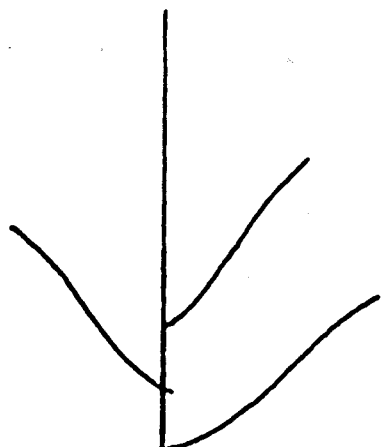
2

dressé à demi-dressé



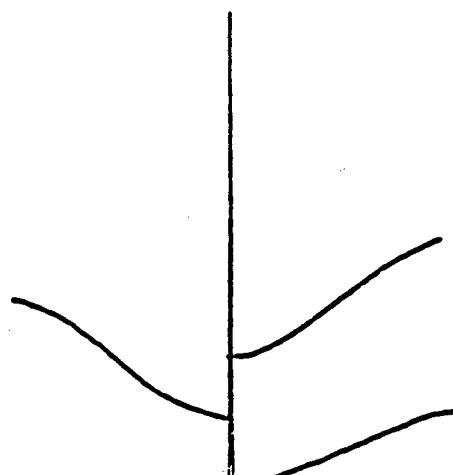
3

demi-dressé



4

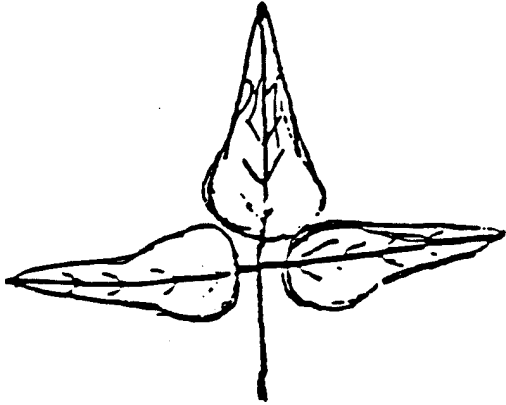
demi-dressé à horizontal



5

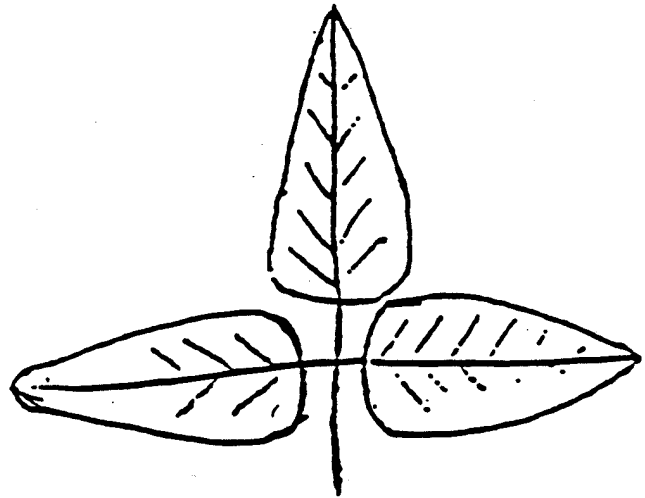
horizontal

Add. 8 : Feuille : forme de la foliole latérale



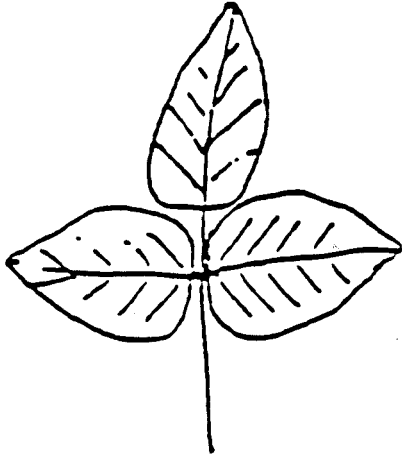
1

lancéolée



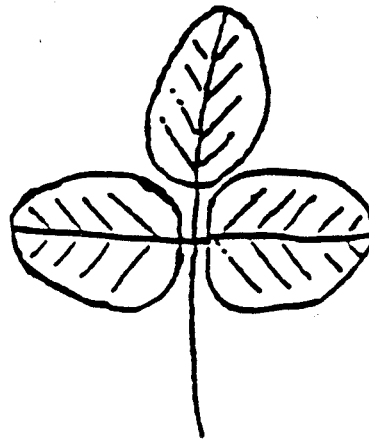
2

triangulaire



3

pointue ovale



4

arrondie ovale



Ad. 16 : Graine : coloration due à l'activité des peroxydases dans le tégument

Soumettre 20 graines par variété aux essais.

Retirer soigneusement le tégument de la graine de manière qu'il ne reste aucun morceau de cotylédon. Pour faciliter cette opération, tremper les graines pendant 2 heures dans de l'eau.

Placer le tégument dans une boîte à compartiments ou dans des tubes (à raison d'une graine par tube), et ajouter 3 à 4 cm<sup>3</sup> de solution de gayacol à 0,5%. Conserver la solution de gayacol à 0,5% au réfrigérateur pendant 2 mois au maximum. Après avoir été exposée à la température ambiante pendant un jour ou davantage, elle ne peut plus être utilisée.

Après 10 minutes d'attente, ajouter une goutte d'une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,1%.

La solution vire au rouge foncé/brun lorsque la réaction est positive et reste incolore en l'absence de réaction. Pour tester la solution de gayacol à 0,5%, il est conseillé d'inclure quelques graines d'une variété de référence ayant une réaction positive. La lecture de la réaction doit être faite au plus tard 60 secondes après l'addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cela est très important car les résultats risquent sinon d'être faussés.

On peut agiter légèrement la boîte à compartiments ou les tubes pour obtenir une meilleure réaction. Pour faciliter la lecture du résultat, placer la boîte ou les tubes sur une surface blanche.

Échelle BBCH des stades phénologiques du soja \*

CODE		DÉFINITION
à 2	à 3	
<b>Stade principal 0 : germination</b>		
00	000	Semence sèche
01	001	Début de l'imbibition de la graine
02	002	-
03	003	Imbibition complète
04	004	-
05	005	La radicule sort de la graine
06	006	L'élongation de la radicule et apparition de poils absorbants
07	007	Hypocotyle et cotylédons percent les téguments de la graine
08	008	Hypocotyle atteint la surface du sol; la courbure de l'hypocotyle est visible, les cotylédons sont encore dans le sol
09	009	Levée : hypocotyle et cotylédons percent la surface du sol ("cracking stage")
<b>Stade principal 1 : développement des feuilles (axe principal)</b>		
10	100	Les cotylédons sont complètement étalés
11	101	La première paire de feuilles est étalée (feuilles simples insérées sur le premier noeud)
12	102	Feuille trifoliolée, insérée sur le 2ème noeud, est étalée
13	103	Feuille trifoliolée, insérée sur le 3ème noeud, est étalée
1.	10.	Et ainsi de suite ...
19	109	Feuille trifoliolée, insérée sur le 9ème noeud, est étalée; aucune pousse latérale n'est visible <sup>1</sup>
-	110	Feuille trifoliolée, insérée sur le 10ème noeud, est étalée <sup>1</sup>
-	111	Feuille trifoliolée, insérée sur le 11ème noeud, est étalée <sup>1</sup>
-	112	Feuille trifoliolée, insérée sur le 12ème noeud, est étalée <sup>1</sup>
-	113	Feuille trifoliolée, insérée sur le 13ème noeud, est étalée <sup>1</sup>
-	11.	Et ainsi de suite ...
-	119	Feuille trifoliolée, insérée sur le 19ème noeud, est étalée <sup>1</sup>

\* Reproduit avec l'aimable autorisation des auteurs du "Stades phénologiques des Mono- et Dicotylédons cultivées (voir Littérature, Meier, Uwe (Editor), 1997).

<sup>1</sup> Le développement des pousses latérales peut commencer plus tôt, dans ce cas continuez avec le stade principal 2.

CODE		DÉFINITION
à 2	à 3	
<b>Stade principal 2 : développement des pousses latérales</b>		
20	200	-
21	201	Première pousse latérale de 1er ordre visible
22	202	Deuxième pousse latérale de 1er ordre visible
23	203	Troisième pousse latérale de 1er ordre visible
2.	20.	Et ainsi de suite ...
29	209	9 ou davantage de pousses latérales de 1er ordre visibles (code à 2 chiffres); neuvième pousse latérale de 1er ordre visible (code 1a 3 chiffres)
-	210	Dixième pousse latérale de 1er ordre visible
-	221	Première pousse latérale de 2ème ordre visible
-	22.	Et ainsi de suite ...
-	229	Neuvième pousse latérale de 2ème ordre visible
-	2n1	Première pousse latérale de n-ième ordre visible
-	2n9	Neuvième pousse latérale de n-ième ordre visible
<b>Stade principal 3 : <sup>2</sup></b>		
<b>Stade principal 4 : développement des parties végétatives de récolte (axe principale)</b>		
40	400	-
41	401	-
42	402	-
43	403	-
44	404	-
45	405	-
46	406	-
47	407	-
48	408	-
49	409	Les parties végétatives de récolte ont atteint leur taille finale (la récolte du soja pour le fourrage est indiquée à ce stade)

<sup>2</sup> L'élongation de la pousse principale s'effectue chez le soja en même temps que le développement des feuilles. Le stade principal 3 est ainsi en parallèle avec le stade principal 1. Il n'y a donc pas de codification du stade principal 3.

CODE		DÉFINITION
à 2	à 3	
<b>Stade principal 5 : apparition de l'inflorescence (axe principal)</b>		
50	500	-
51	501	Les premiers boutons floraux sont visibles
52	502	-
53	503	-
54	504	-
55	505	Grossissement des premiers boutons floraux
56	506	-
57	507	-
58	508	-
59	509	Les premiers pétales sont visibles; les fleurs sont toujours fermées
<b>Stade principal 6 : floraison (axe principal)</b>		
60	600	Les premières fleurs de la population sont ouvertes par ci par là
61	601	Début de la floraison environ 10 % des fleurs sont ouvertes <sup>3</sup> Début de la floraison <sup>4</sup>
62	602	Environ 20 % des fleurs sont ouvertes <sup>3</sup>
63	603	Environ 30 % des fleurs sont ouvertes <sup>3</sup>
64	604	Environ 40 % des fleurs sont ouvertes <sup>3</sup>
65	605	Pleine floraison : environ 50 % des fleurs sont ouvertes <sup>3</sup> Période principale de floraison <sup>4</sup>
66	606	Environ 60 % des fleurs sont ouvertes <sup>3</sup>
67	607	La floraison s'achève <sup>3</sup>
68	608	-
69	609	Fin de la floraison : les premières gousses sont visibles (~ 5 mm) <sup>3</sup>

<sup>3</sup> Pour les variétés à période de floraison déterminée

<sup>4</sup> Pour les variétés à période de floraison non déterminée

CODE		DÉFINITION
à 2	à 3	
<b>Stade principal 7 : développement des fruits et graines</b>		
70	700	La première gousse a atteint sa longueur finale (15-20 mm)
71	701	Environ 10 % des gousses ont atteint la longueur finale (15-20 mm) <sup>3</sup> Début du développement des gousses <sup>4</sup>
72	702	Environ 20 % des gousses ont atteint la longueur finale (15-20 mm) et elles commencent à se remplir de graines <sup>3</sup>
73	703	Environ 30 % des gousses ont atteint la longueur finale (15-20 mm) et elles commencent à se remplir de graines <sup>3</sup> Début du remplissage des gousses <sup>4</sup>
74	704	Environ 40 % des gousses ont atteint la longueur finale (15-20 mm) et elles commencent à se remplir de graines <sup>3</sup>
75	705	Environ 50 % des gousses ont atteint la longueur finale (15-20 mm) et elles commencent à se remplir de graines <sup>3</sup> Période principale du développement des gousses <sup>4</sup>
76	706	-
77	707	Environ 70 % des gousses ont atteint la longueur finale (15-20 mm) et le remplissage des gousse est avancé <sup>3</sup> Avancement du remplissage des gousses <sup>4</sup>
78	708	-
79	709	Quasi toutes les gousses ont atteint la longueur finale (15-20 mm) et les graines remplissent la plus grande partie des gousses <sup>3</sup> La majorité des gousses ont atteint la longueur finale et la plupart est remplis de graines <sup>3,4</sup>
<b>Stade principal 8 : maturation des fruits et graines</b>		
80	800	La première gousse est mûre, les graines ont atteint la couleur typique et elles sont sèches et dures
81	801	Début de la maturation : environ 10 % des gousses sont mûres, graines sèches et dures et à couleur typique <sup>3</sup> Début de la maturation des gousses et graines <sup>4</sup>
82	802	Environ 20 % des gousses sont mûres, graines sèches et dures et à couleur typique <sup>3</sup>

<sup>3</sup> Pour les variétés à période de floraison déterminée

<sup>4</sup> Pour les variétés à période de floraison non déterminée

<b>CODE</b>		<b>DÉFINITION</b>
<b>à 2</b>	<b>à 3</b>	
83	803	Environ 30 % des gousses sont mûres, graines sèches et dures et à couleur typique <sup>3</sup>
84	804	Environ 40 % des gousses sont mûres, graines sèches et dures et à couleur typique <sup>3</sup>
85	805	Maturation avancée : environ 50 % des gousses sont mûres, graines sèches et dures et à couleur typique <sup>3</sup> Période principale de la maturation des gousses et graines <sup>4</sup>
86	806	Environ 60 % des gousses sont mûres, graines sèches et dures et à couleur typique <sup>3</sup>
87	807	Environ 70 % des gousses sont mûres, graines sèches et dures et à couleur typique <sup>3</sup>
88	808	Environ 80 % des gousses sont mûres, graines sèches et dures et à couleur typique <sup>3</sup>
89	809	Maturation complète : quasi toutes les gousses sont mûres, graines sèches et dures et à couleur typique (= maturité exigée pour la récolte) <sup>3</sup> La plupart des gousses sont mûres, les graines ont atteint la couleur typique et elles sont sèches et dures <sup>4</sup>
<b>Stade principal 9 : sénescence</b>		
90	900	-
91	901	Environ 10 % des feuilles sont décolorées ou tombées
92	902	Environ 20 % des feuilles sont décolorées ou tombées
93	903	Environ 30 % des feuilles sont décolorées ou tombées
94	904	Environ 40 % des feuilles sont décolorées ou tombées
95	905	Environ 50 % des feuilles sont décolorées ou tombées
96	906	Environ 60 % des feuilles sont décolorées ou tombées
97	907	Les parties aériennes de la plante sont mortes
98	908	-
99	909	Produit après récolte (graines)

<sup>3</sup> Pour les variétés à période de floraison déterminée

<sup>4</sup> Pour les variétés à période de floraison non déterminée

## IX. Littérature

Buzzell and Buttery, 1969: Inheritance of peroxidase activity on soybean seed coats. *Crop Sci.*, 9, 387-388.

Cardy, B.J. and Beversdorf, W.D., 1984: Identification of soybean cultivars using isoenzyme electrophoresis. *Seed Sci. Technol.*, 12 (3), 943-954.

Gorman, M.B. and Kiang, Y.T., 1977: Variety specific electrophoretic variants of four soybean enzymes. *Crop Sci.*, 17 (6), 963-965.

Gorman, M.B. and Kiang, Y.T., 1983: Inheritance of soybean electrophoretic variants. *Soybean Genet. Newsl.*, 10, 67-84.

Kiang, Y.T. and Gorman, M.B., 1985: Inheritance of NADP active isocitrate dehydrogenase isozymes in soybean. *J. Hered.*, 76, 279-284.

Palmer, R.G., Shoemaker, R.C. and Rennie, B., 1987: Approved soybean gene symbols. *Soybean Genet. Newsl.*, 41-58

Bourgoin-Greneche M. and Lallemand J., 1993: "L'électrophorèse et son application à la description des variétés. Présentation des techniques utilisées par le GEVES," GEVES, France

Meier, Uwe (Editor), 1997: "Growth Stages of Mono- and Dicotyledonous Plants", BBCH-Monograph, Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin-Wien 1997 (quadrilingual version: English, français, deutsch, español)

X. Questionnaire technique

	Référence (réservé aux Administrations)
<p><b>QUESTIONNAIRE TECHNIQUE</b> à remplir en relation avec une demande de certificat d'obtention végétale</p>	
1. Espèce	<p><i>Glycine max</i> (L.) Merrill.  SOJA</p>
2. Demandeur (nom et adresse)	
3. Dénomination proposée ou référence de l'obtenteur	



4. Renseignements sur l'origine, le maintien et la reproduction ou la multiplication de la variété

4.1 Origine génétique et mode d'obtention

- a) La législation en matière de protection de l'environnement et de la santé de l'homme et de l'animal soumet-elle la variété à une autorisation préalable pour la dissémination?

Oui [ ] Non [ ]

- b) Dans l'affirmative, une telle autorisation a-t-elle été obtenue?

Oui [ ] Non [ ]

Si oui, veuillez joindre une copie de l'autorisation.

4.2 Autres renseignements

5. Caractères de la variété à indiquer (le nombre entre parenthèses renvoie au caractère correspondant dans les principes directeurs d'examen; prière de marquer d'une croix le niveau d'expression approprié)

Caractères	Exemples	Note
<b>5.1 Plante: couleur de la pilosité de la tige principale (5) (au tiers central; à l'époque de floraison)</b>		
grise	Apache, Alaric, Talon, Imari	1[ ]
fauve	Maple Glen, Chandor, Paoki, Agata	2[ ]
<b>5.2 Fleur: couleur (à pleine floraison) (11)</b>		
blanche	Chandor, Crésir, Toréador	1[ ]
violette	Fransoy 242, Imari, Apache, Queen	2[ ]
<b>5.3 Graine: couleur du hile (17)</b>		
gris	Spot, Major, Apache	1[ ]
jaune	Maple Arrow, Imari, Talon	2[ ]
brun clair	Kingsoy, Argenta, Baron, Opale	3[ ]
brun foncé	Fransoy 242, Aurélia, Léman	4[ ]
noir imparfait	Wells, Kador, Folio	5[ ]
noir	Chandor, Queen, Paoki	6[ ]

Caractères	Exemples	Note
<b>5.4 Plante: époque de maturité (20)</b>		
très précoce	Trump, Soléo, Kola, Carla, Paradis	1[ ]
très précoce à précoce	Chandor, Apache, Labrador	2[ ]
précoce	Canton, Queen, Paoki, Aurélia	3[ ]
précoce à moyenne	Kador, Kingsoy, Alaric, Niva	4[ ]
moyenne	Williams	5[ ]
moyenne à tardive		6[ ]
tardive		7[ ]
tardive à très tardive		8[ ]
très tardive		9[ ]

6. Variétés voisines et différences par rapport à ces variétés

Dénomination de la variété voisine	Caractère par lequel la variété voisine diffère <sup>o)</sup>	Niveau d'expression pour la variété voisine	Niveau d'expression pour la variété candidate
------------------------------------	---	---	---

<sup>o)</sup> Au cas où les niveaux d'expression des deux variétés seraient identiques, prière d'indiquer l'amplitude de la différence

7. Renseignements complémentaires pouvant faciliter la détermination des caractères distinctifs de la variété

7.1 Résistance aux parasites et aux maladies

7.2 Conditions particulières pour l'examen de la variété

7.3 Autres renseignements

[L'annexe suit]

ANNEXE\*

Explications additionnelles utiles

	<u>SOMMAIRE</u>	<u>PAGE</u>
Partie I	Introduction .....	2
Partie II	Caractères obtenus par l'utilisation de l'électrophorèse .....	3
Partie III	Description de la méthode à utiliser .....	5

---

\* Cette annexe est acceptée seulement provisoirement et peut être modifiée lorsque plus d'information sera disponible.

## Partie I

### Introduction

L'annexe suivante comprend une liste des caractères obtenus par l'utilisation de l'électrophorèse et une description de la méthode à appliquer. L'UPOV a décidé de faire figurer ces caractères dans une annexe aux Principes directeurs, en créant ainsi une catégorie spéciale de caractères, étant donné que la majorité des États membres de l'UPOV sont d'avis qu'il n'est pas possible d'établir la distinction uniquement sur la base d'une différence pour un caractère obtenu par l'utilisation de l'électrophorèse. Ces caractères doivent par conséquent être utilisés uniquement comme complément aux différences constatées pour des caractères morphologiques ou physiologiques. L'UPOV confirme que ces caractères sont considérés comme utiles, mais que, pris isolément, ils ne peuvent pas être suffisants pour établir la distinction. Ils ne doivent pas être utilisés comme caractères de routine, mais seulement sur demande ou avec accord du demandeur.

Pour analyser les enzymes, il est recommandé de pratiquer l'électrophorèse sur gel d'amidon. Un polymorphisme des enzymes (par exemple 8 loci des enzymes) peut être observé. Le contrôle génétique est connu pour chaque locus d'enzyme. Pour la description de la méthode veuillez vous référer à "L'électrophorèse et son application à la description des variétés. Présentation des techniques utilisées par le GEVES" par Mireille Bourgoïn-Greñeche et Joëlle Lallemand, GEVES, septembre 1993, et aux références supplémentaires décrites dans le chapitre IX, littérature, de ces principes directeurs d'examen.

Partie II

Caractères obtenus par l'utilisation de l'électrophorèse

English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
<b>21. Allele expression at gene locus Pgd</b>	<b>Expression allélique au locus Pgd</b>	<b>Allel-Ausprägung im Genlocus Pgd</b>	<b>Expresión del alelo en el locus Pgd</b>		
Genotype	Génotype	Genotyp	Genotipo		
a/a	a/a	a/a	a/a	Essor	1
b/b	b/b	b/b	b/b	Apache	2
<b>22. Allele expression at gene locus Idh 1 + Idh 2</b>	<b>Expression allélique au locus Idh 1 + Idh 2</b>	<b>Allel-Ausprägung in den Genloci Idh 1 + Idh 2</b>	<b>Expresión del alelo en los loci Idh 1 + Idh 2</b>		
Genotype	Génotype	Genotyp	Genotipo		
a/a + a/a	a/a + a/a	a/a + a/a	a/a + a/a	Imari	1
a/a + b/b	a/a + b/b	a/a + b/b	a/a + b/b	Apache	2
b/b + a/a	b/b + a/a	b/b + a/a	b/b + a/a	Essor	3
b/b + b/b	b/b + b/b	b/b + b/b	b/b + b/b	Sapporo	4
<b>23. Allele expression at gene locus Ep</b>	<b>Expression allélique au locus Ep</b>	<b>Allel-Ausprägung im Genlocus Ep</b>	<b>Expresión del alelo en el locus Ep</b>		
Genotype*	Génotype*	Genotyp*	Genotipo*		
Ep a/Ep a	Ep a/Ep a	Ep a/Ep a	Ep a/Ep a	Apache	1
ep n/ep n	ep n/ep n	ep n/ep n	ep n/ep n	Goldor	2
<b>24. Allele expression at gene locus Mpi</b>	<b>Expression allélique au locus Mpi</b>	<b>Allel-Ausprägung im Genlocus Mpi</b>	<b>Expresión del alelo en el locus Mpi</b>		
Genotype	Génotype	Genotyp	Genotipo		
b/b	b/b	b/b	b/b	Essor	1
c/c	c/c	c/c	c/c	Apache	2

\* La nomenclature utilisée pour les gènes et les allèles est la nomenclature approuvée par le "Soybean Genetics Committee" (PALMER *et al*, 1987). Nous avons cependant rajouté "n" aux allèles nuls "dia3" et "ep" et "a" aux allèles actifs "Ep" et "Dia3" pour faciliter leur distinction de la dénomination des gènes et pour permettre la désignation de nouveaux allèles dans le futur.

English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
<b>25. Allele expression at gene locus Pgm 1</b>	<b>Expression allélique au locus Pgm 1</b>	<b>Allel-Ausprägung im Genlocus Pgm 1</b>	<b>Expresión del alelo en el locus Pgm 1</b>		
Genotype	Génotype	Genotyp	Genotipo		
a/a	a/a	a/a	a/a	Apache	1
b/b	b/b	b/b	b/b	Essor	2
<b>26. Allele expression at gene locus Acp</b>	<b>Expression allélique au locus Acp</b>	<b>Allel-Ausprägung im Genlocus Acp</b>	<b>Expresión del alelo en el locus Acp</b>		
Genotype	Génotype	Genotyp	Genotipo		
a/a	a/a	a/a	a/a	Goldor	1
b/b	b/b	b/b	b/b	Apache	2
<b>27. Allele expression at gene locus Dia 3</b>	<b>Expression allélique au locus Dia 3</b>	<b>Allel-Ausprägung im Genlocus Dia 3</b>	<b>Expresión del alelo en el locus Dia 3</b>		
Genotype*	Génotype*	Genotyp*	Genotipo*		
Dia3 a/Dia3 a	Dia3 a/Dia3 a	Dia3 a/Dia3 a	Dia3 a/Dia3 a	Apache	1
dia3 n/dia3 n	dia3 n/dia3 n	dia3 n/dia3 n	dia3 n/dia3 n	Goldor	2



### Partie III

#### Description de la méthode à utiliser

##### Méthode d'électrophorèse en gel d'amidon pour l'analyse des isozymes de soja

1. Nombre de graines pour le test de distinction, homogénéité et stabilité :

Au moins 20

2. Appareillage et équipement

On peut utiliser n'importe quel système d'électrophorèse horizontal à condition que les gels puissent être réfrigérés à 4°C. Une épaisseur de gel de 10 mm est recommandée. Il faut utiliser un générateur pouvant délivrer un voltage constant.

3. Produits

Tous les produits doivent être du niveau "réactif analytique" ou mieux.

3.1 Produits pour l'extraction des enzymes

β-mercaptoéthanol  
Acide chlorhydrique (HCl)  
Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane (Tris)

3.2 Produits pour l'électrophorèse

Bleu de bromophénol  
Acide citrique monohydraté  
L-Histidine  
Amidon hydrolysé, pour électrophorèse, (Sigma s-4501 ou équivalent)

### 3.3 Produits pour la coloration des enzymes

Acetate de sodium trihydraté  
Acide acétique glacial  
Acide chlorhydrique (HCl)  
Acide isocitrique DL-sel de Na<sub>3</sub>  
DL- acide malique  
Acide 6-phosphogluconique, sel de Na<sub>3</sub> dihydraté  
Chlorure de magnesium hexahydraté  
Diméthylthiazol diphényl tétrazolium (MTT)  
Ethanol  
Ethylènediamine tétra-acétique acide sel de Na<sub>2</sub> (EDTA)  
Fast Garnet GBC salt  
Glucose 1-phosphate déshydrogénase (Serva 22820 ou 22822 ou Sigma G5885)  
Hanker yates  
Hydroxide de sodium (NaOH)  
Menadoine  
1-Naphthylphosphate sel de Na<sub>3</sub> dihydraté  
β-Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD)  
β-Nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH)  
β-Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP)  
Nitro-blue tétrazolium (NBT)  
Peroxyde d'hydrogène  
Phénazine méthosulfate (PMS)  
Polyvinylpyrrolidone 40 (PVP-40)  
Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane (Tris)

## 4. Solutions

### 4.1 Solution d'extraction

10 ml de Tris-HCl pH 7,5 (4.3.1.3)  
+ 20µl β-mercaptoethanol  
ajusté à 100 ml avec de l'eau désionisée

### 4.2 Tampons d'électrophorèse

4.2.1 Solution stock : L-histidine-citrate 0,364 M  
50,44 g de L-histidine  
8,20 g d'acide citrique monohydraté  
ajusté à 1 l avec de l'eau désionisée

4.2.2 Tampon de migration : L-histidine-citrate 0,072 M, pH 6,5  
(solution stock diluée 5 fois)  
400 ml de solution stock (4.2.1) ajusté à 2 l avec de l'eau désionisée

- 4.2.3 Tampon gel : L-histidine-citrate 0,024 M  
(solution stock diluée 15 fois)  
80 ml de solution stock (4.2.1) ajusté à 1200 ml avec de l'eau désionisée
- 4.2.4 Solution de bleu de bromophénol  
50 mg de bleu de bromophénol dissout dans 100 ml d'eau désionisée
- 4.3 Solutions de coloration
- 4.3.1 Solutions stock
- 4.3.1.1 Tris-HCl 1 M, pH 8,0  
121,1 g de Tris, ajusté à 1 l avec de l'eau désionisée et à pH 8,0 avec de l'HCl à 50 %
- 4.3.1.2 Tris-HCl 1 M, pH 9  
121,1 g Tris, ajusté à 1 l avec de l'eau désionisée et à pH 9 avec de l'HCl à 50 %
- 4.3.1.3 1 M Tris-HCl pH 7,5  
121,1 g Tris, ajusté à 1 l avec de l'eau désionisée et ajusté à pH 7,5 avec de l'HCl à 50 %
- 4.3.1.4 solution de MTT  
1,0 g MTT ajusté à 100 ml avec de l'eau désionisée
- 4.3.1.5 solution de NBT  
1,0 g NBT ajusté à 100 ml avec de l'eau désionisée
- 4.3.1.6 solution de PMS  
200 mg de PMS, ajusté à 100 ml avec de l'eau désionisée
- 4.3.1.7 solution de Mg deCl<sub>2</sub>  
21,35 g de MgCl<sub>2</sub> hexahydraté  
ajusté à 100 ml avec de l'eau désionisée
- 4.3.1.8 acétate de sodium 1 M, pH 5,5  
136,08 g d'acétate de sodium trihydraté, ajusté à 1 l avec de l'eau désionisée et à pH 5,5 avec de l'acide acétique glacial

- 4.3.2 Solutions de coloration (volume: 200 ml)
- 4.3.2.1 solution de coloration PGD + IDH  
20 ml de Tris-HCl pH 8,0 (4.3.1.1)  
+ 180 ml d'eau désionisée  
+ 100 mg d'acide DL-Isocitrique sel de Na<sub>3</sub>  
+ 100 mg de 6-phosphogluconique acid sel de Na<sub>3</sub> dihydraté  
+ 10 ml de solution de MgCl<sub>2</sub> (4.3.1.7)  
+ 6 mg de NADP  
+ 4 ml de solution MTT (4.3.1.4)  
+ 4 ml de solution PMS (4.3.1.6)
- 4.3.2.2 solution de coloration PRX  
40 ml de Tris HCl pH 9,0 (4.3.1.2)  
+ 160 ml d'eau désionisée  
+ 34 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
+ 200 mg de Hanker yates
- 4.3.2.3 solution de coloration MPI  
16 ml de Tris-HCl pH 7,5 (4.3.1.3)  
+ 72 ml d'eau désionisée  
+ 48 mg de Mannose 6-phosphate, sel de Na<sub>2</sub>  
+ 1,6 ml de MgCl<sub>2</sub> solution (4.3.1.7)  
+ 20 mg de NADP  
+ 2 ml de solution MTT (4.3.1.4)  
+ 10 ml de solution PMS (4.3.1.6)  
+ 60 unités de Glucose 6-phosphate déshydrogénase  
+ 120 unités de Phospho glucose isomérase  
+ 100 ml d'agar à 2%
- 4.3.2.4 solution de coloration PGM  
20 ml de Tris-HCl pH 8,0 (4.3.1.1)  
+ 180 ml d'eau désionisée  
+ 200 mg de Glucose 1 phosphate  
+ 20 ml de solution MgCl<sub>2</sub> (4.3.1.7)  
+ 10 mg de NADP  
+ 3 ml de solution MTT (4.3.1.4)  
+ 2 ml de solution PMS (4.3.1.6)  
+ 120 unités Glucose 6-phosphate déshydrogénase
- 4.3.2.5 solution de coloration ACP  
40 ml d'acétate de sodium pH 5,5 (4.3.1.8)  
+ 160 ml d'eau désionisée  
+ 150 mg de Fast Garnet GBC salt  
+ 200 mg de 1-Naphthylphosphate sel de Na<sub>3</sub> dihydraté  
+ 0,5 ml de solution MgCl<sub>2</sub> (4.3.1.7)

- 4.3.2.6 solution de coloration DIA  
10 ml de Tris-HCl pH 7,5 (4.3.1.1)  
+ 190 ml d'eau désionisée  
+ 68 mg de NADH  
+ 2,7 ml de solution NBT (4.3.1.5)  
+ 53 mg de Ménadione

## 5. Déroulement de la manipulation

### 5.1 Extraction des enzymes

Les graines sont écrasées une par une avec un marteau et ajoutées à 1 ml de tampon d'extraction (4.1) à 4°C.

### 5.2 Préparation des gels

Pour faire deux gels d'amidon à 12,5 % (18 x 18 x 1 cm), préparer 128 g d'amidon mélangés à 1020 ml de tampon gel dans un flacon Buchner de 1000 ml. Faire chauffer à 80 ° C. Le mélange est ensuite dégazé pendant 40 secondes. Les gels sont coulés dans des moules comme décrit dans le manuel utilisateur à la rubrique équipement utilisé. La formation de bulles d'air doit être évitée. Les gels sont laissés à refroidir à température ambiante, pendant au moins deux heures, et enveloppés dans un film de polyéthylène pour la nuit. Avant l'électrophorèse, les gels sont refroidis à 4°C pendant au moins une heure.

### 5.3 Électrophorèse

- 5.3.1 Les cuves sont remplies avec le volume approprié de tampon bac (4.2.1.2 ou 4.2.2.1) à 4 ° C. Une fente est découpée dans le gel à 1 cm de la cathode. Les extraits du paragraphe 5.1 (30 extraits pour des gels de 18 x 18 x 1 cm) sont déposés sur des mèches de papier Whatman n° 3 mesurant 15 x 2 x 1 mm. Les mèches sont placées dans la fente. À 1 cm des extrémités de la fente, une mèche imbibée de bleu de bromophénol est insérée. L'électrophorèse se fait à 4 ° C. Un voltage constant de 200 V (150 mA au maximum pour deux gels de 18 x 18 x 1 cm) est appliqué pendant 20 minutes. Les mèches sont ensuite retirées et l'électrophorèse continue à un voltage constant de 280 V (180 mA au maximum pour deux gels de 18 x 18 x 1), jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait migré de 13 cm (environ 4 heures).

#### 5.4 Coloration

Après l'électrophorèse, le gel est coupé horizontalement en tranches de 1 mm d'épaisseur. La tranche supérieure est jetée. Les tranches sont colorées individuellement par incubation à 37 ° C et à l'obscurité dans les solutions suivantes :

pour PGD et IDH : solution 4.3.2.1,                      pour PRX : solution 4.3.2.2,  
 pour : MPI                      solution 4.3.2.3,                      pour PGM : solution 4.3.2.4,  
 pour ACP :                      solution 4.3.2.5,                      pour DIA : solution 4.3.2.6

Les durées d'incubation sont comprises entre 30 et 120 minutes. Après la coloration, les tranches sont rincées dans de l'eau distillée avant d'être stockées. On peut utiliser les procédés suivants pour un stockage à long terme : séchage des gels entre deux feuilles de Cellophane ou stockage dans des sacs de polyéthylène scellés.

#### 6. Reconnaissance des allèles codant pour les isoenzymes

##### 6.1 Reconnaissance des allèles codant pour les PGD

##### 6.1.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	Structure quaternaire	Locus	Allèles
Phosphoglucose déshydrogénase (PGD)	Dimérique	Pgd	a (Essor) b (Apache)

##### 6.1.2 Représentation graphique des zymogrammes

	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>bbb</td> <td>bbb</td> </tr> <tr> <td>bbb</td> <td>bbb</td> </tr> <tr> <td>bbb</td> <td>bbb</td> </tr> <tr> <td>bbb</td> <td>bbb</td> </tr> </tbody> </table>	bbb	bbb	bbb	bbb	bbb	bbb	bbb	bbb
bbb	bbb								
bbb	bbb								
bbb	bbb								
bbb	bbb								
Pgd 1	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>a/a</td> <td>b/b</td> </tr> </tbody> </table>	a/a	b/b						
a/a	b/b								

## 6.2 Reconnaissance des allèles codant pour les IDH

### 6.2.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	Structure quaternaire	Locus	Allèles	
Isocitrate déshydrogénase (IDH)	Dimérique	Idh1	a (Apache) b (Essor)	interactions intergéniques
		Idh2	a (Essor) b (Apache)	

Il y a des interactions entre les produits des gènes (sous-unités polypeptidiques) codés par Idh1 et Idh2. Il est plus facile d'analyser les 2 gènes en combinaison :

Génotype		Variétés témoins
<i>Idh1</i>	<i>Idh2</i>	
b/b	a/a	Essor
a/a	a/a	Imari
b/b	b/b	Sapporo
a/a	b/b	Apache

### 6.2.2 Représentation graphique des zymogrammes

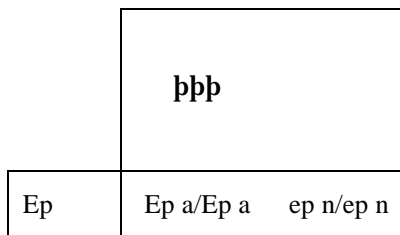
			bbb	bbb
	bbb	bbb	bbb	bbb
		bbb	bbb	bbb
Idh1	b/b	a/a	b/b	a/a
Idh2	a/a	a/a	b/b	b/b

## 6.3 Reconnaissance des allèles codant pour les PRX

### 6.3.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	structure quaternaire	Locus	Allèles
Péroxydase (PRX)	Dimérique	Ep	Ep a (Apache) ep n (Goldor)

6.3.2 Représentation graphique des zymogrammes

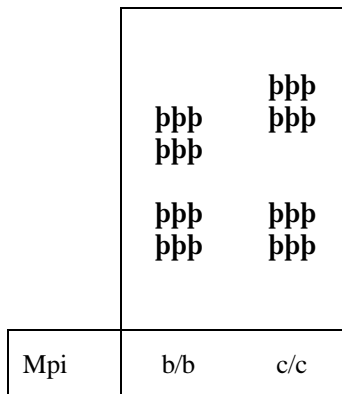


6.4 Reconnaissance des allèles codant pour les MPI

6.4.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	structure quaternaire	Locus	Allèles
Mannose phosphate déshydrogénase (MPI)	Dimérique	Mpi	b (Essor) c (Apache)

6.4.2 Représentation graphique des zymogrammes



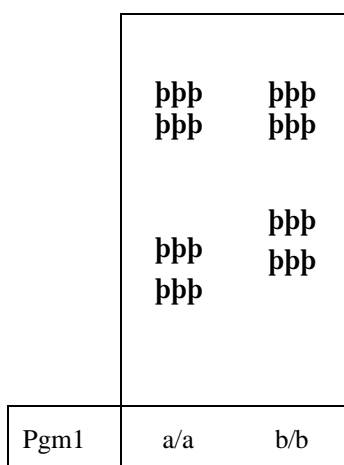
6.5 Reconnaissance des allèles codant pour les PGM

6.5.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	structure quaternaire	Locus	Allèles
Phosphoglucomutase (PGM)	Monomérique	Pgm1	a (Apache) b (Essor)



## 6.5.2 Représentation graphique des zymogrammes

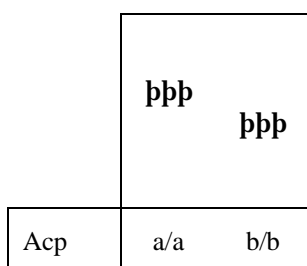


## 6.6 Reconnaissance des allèles codant pour les ACP

### 6.6.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	structure quaternaire	Locus	Allèles
phosphatase acide (ACP)	Dimérique	Acp	a (Goldor) b (Apache)

### 6.6.2 Représentation graphique des zymogrammes



## 6.7 Reconnaissance des allèles codant pour les DIA

### 6.7.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	structure quaternaire	Locus	Allèles	
Diaphorase (DIA)	Tetramérique	Dia3	Dia3 a (Apache) dia3 n (Goldor)	interactions intergéniques

Il y a des interactions intergéniques entre Dia3 et Dia4

6.7.2 Représentation graphique des zymogrammes

	<table border="1"><tr><td>bbb</td><td>bbb</td></tr><tr><td>bbb</td><td>bbb</td></tr><tr><td>bbb</td><td>bbb</td></tr><tr><td>bbb</td><td>bbb</td></tr><tr><td>bbb</td><td></td></tr><tr><td>bbb</td><td></td></tr><tr><td>bbb</td><td>bbb</td></tr><tr><td>bbb</td><td>bbb</td></tr><tr><td>bbb</td><td>bbb</td></tr></table>	bbb	bbb	bbb	bbb	bbb	bbb	bbb	bbb	bbb		bbb		bbb	bbb	bbb	bbb	bbb	bbb
bbb	bbb																		
bbb	bbb																		
bbb	bbb																		
bbb	bbb																		
bbb																			
bbb																			
bbb	bbb																		
bbb	bbb																		
bbb	bbb																		
Dia 3	<table border="1"><tr><td>Dia3 a/</td><td>dia3 n/</td></tr><tr><td>Dia3 a</td><td>dia3 n</td></tr></table>	Dia3 a/	dia3 n/	Dia3 a	dia3 n														
Dia3 a/	dia3 n/																		
Dia3 a	dia3 n																		

[Fin du document]